第 38 卷第 5 期
2018 年 3 月
生　态　学　报
ACTA ECOLOGICA SINICA
Vol.38,No.5
Mar.,2018

DOI: 10.5846/stxb201702060218
刘海洋,姚举,张仁福,王伟,余璇,王琦.黄萎病不同发生程度棉田中土壤微生物多样性.生态学报,2018,38(5):1619-1629.
Liu H Y, Yao J, Zhang R F, Wang W, Yu X, Wang Q.Analysis of soil microbial diversity in cotton fields differing in occurrence of cotton *Verticillium* wilt in Xinjiang.Acta Ecologica Sinica,2018,38(5):1619-1629.

黄萎病不同发生程度棉田中土壤微生物多样性

刘海洋[1,2],姚　举[2],张仁福[2],王　伟[2],余　璇[3],王　琦[1,*]
1 中国农业大学植物保护学院, 北京　100193
2 新疆农业科学院植物保护研究所, 乌鲁木齐　830091
3 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐　830091

摘要:作物根际土壤微生物群落对土壤生态及作物健康至关重要。以棉花黄萎病不同发生程度棉田的土壤为研究对象,采用理化分析、微生物纯培养及高通量测序技术对土壤理化性质及微生物数量、细菌丰度多样性进行综合分析。结果表明:在纯培养条件下,大丽轮枝菌无菌发酵滤液对细菌生长有明显的抑制作用;棉田接种大丽轮枝菌对土壤中细菌、真菌、放线菌的数量及细菌菌群丰度多样性未产生明显影响,不同采样时间的土壤中细菌菌群结构差异更大。土壤中大丽轮枝菌微菌核数量与棉花黄萎病的发生程度呈显著正相关。土壤肥力对土壤中微生物数量起主导作用,而水稻-棉花轮作能够使棉田有效降盐、减病、改善土壤肥力。通过生物防治、作物轮作、深翻等调控措施增加土壤中有益菌群数量、改善土壤生态、降低棉田土壤中大丽轮枝菌菌源数量是减轻棉花黄萎病危害的基础。

关键词:根际土壤微生物;棉花黄萎病;高通量测序;土壤肥力

Analysis of soil microbial diversity in cotton fields differing in occurrence of cotton *Verticillium* wilt in Xinjiang

LIU Haiyang[1,2], YAO Ju[2], ZHANG Renfu[2], WANG Wei[2], YU Xuan[3], WANG Qi[1,*]
1 *College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing* 100193, *China*
2 *Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi* 830091, *China*
3 *College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi* 830091, *China*

Abstract: Soil microbial community composition of crop rhizosphere is very important in soil ecology and crop health. In this paper, the soil with different levels of cotton *Verticillium* wilt is the research object. Moreover, physical and chemical properties of soil, and rhizosphere microbial community diversity were analyzed with the technique of microbial pure culture, physical and chemical analysis and high-throughput sequencing. The results indicate that sterile fermentation liquor of *Verticillium dahliae* has obvious inhibitory effect on bacterial growth in pure culture conditions. After inoculation with *V. dahliae*, the quantity of bacteria, fungi, and actinomycetes in the cotton soil show little change compared to that in the control. High-throughput sequencing analysis indicates that bacterial genetic relationship in soil shows no significant change, and sampling time has a bigger impact on the bacterial population structure. Soil fertility plays a key role in determining the quantity of bacteria, fungi, and actinomycetes in continuous cotton cropping soil, in which *Verticillium* wilt occurrence is severe and significantly higher than that in the control field. Rice-cotton rotation cropping has a strong effect on reducing salt, plant diseases, and improving soil fertility. Microsclerotia content in soil has significant positive correlation with the

基金项目:新疆自治区重点研发计划项目(2016B01001-6);国家棉花产业技术体系岗位科学家项目(CARS-18);公益性行业(农业)科研专项经费项目(201503112-6)

收稿日期:2017-02-06;　**网络出版日期**:2017-11-21

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: wangqi@ cau.edu.cn

incidence of cotton *Verticillium* wilt. Soil fertility, culture measures, and crop varieties mainly influence soil microorganism quantity; however, *Verticillium* wilt occurrence does not cause significant change in microbial quantity. Reducing the quantity of microsclerotia in soil is the fundamental method of controlling *Verticillium* wilt.

Key Words: rhizosphere soil microorganism; cotton *Verticillium* wilt; high-throughput sequencing; soil fertility

新疆是我国最大的棉花种植区,棉花年产量占全国六成以上,棉花区位优势明显。近年来随着棉区重心向新疆转移,棉种跨区调运、病区棉秸秆还田加之长年连作等问题突出,致使棉花黄萎病在新疆发生加重、复杂。调查表明,新疆棉花黄萎病发病田占比超过 50.0%,病情指数达 5.0 以上的严重发病田占比 25.0%以上[1],部分棉区该病危害十分较重,已成为制约新疆棉花生产的关键因素。

棉花黄萎病是系统性侵染的土传病害,其病原菌为大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*),防治十分困难。生物防治被认为是治理棉花黄萎病最具潜力的方法[2],但是,实践应用中发现,在利用生防菌剂或生物有机肥等防治棉花黄萎病时,存在防治效果不稳定的问题。棉花根际土壤微生物、大丽轮枝菌、土壤之间通过复杂的相互作用形成的微生态系统,是影响棉花黄萎病发生、制约生防菌剂防效的重要因素。

作物根部土壤中微生物群落结构及其组成变化能反映土壤生态现状及变化趋势,对作物健康十分重要。研究认为,不同棉花品种[3-9]、长年连作[10-13]、秸秆还田[14]、作物套种[15]、水稻轮作[16]等都会造成棉田土壤中微生物多样性水平、土壤酶活性、土壤微生物量等发生改变。但是,目前缺乏对不同黄萎病发生程度棉田中的土壤微生物多样性差异的研究。本文以棉花黄萎病不同发生程度棉田土壤为研究对象,深入分析不同发病程度棉田土壤中微生物群落的多样性以及土壤理化性质差异,探究土壤中制约棉花黄萎病发生的关键因素,揭示棉花黄萎病发生与土壤微生物种群之间的相关性,为利用微生态调控手段进行棉花黄萎病的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株

大丽轮枝菌强致病力菌株 V991 及弱致病力菌株 V250,由中国农业科学院植物保护研究所惠赠;本实验室保存的细菌菌株 AL7。

1.1.2 土壤样品采集与处理

在阿克苏市、库尔勒市、石河子市三地分别选择棉花黄萎病重病田和无病田(轻病田)各 1 块。于 4 月 20 日、5 月 20 日、6 月 20 日、8 月 10 日分别取棉花根围 10cm 深耕层土样,每块棉田对角线 3 点取样,每点间隔 50m,每点取 5 份小样,每份小样 500g 土壤,混合成 1 份土样。共采集 72 份土样。

土样经 2mm 孔径过筛后分 3 份保存:一份保存于-80℃,供提取土壤 DNA 进行高通量测序分析;一份保存于 4℃冰箱供土壤微生物数量分析;一份土样风干后保存,进行土壤理化性质分析。

1.1.3 取样棉田背景

阿克苏无病田为水稻轮作改良棉田(前茬为重病田);重病田为相邻长年连作棉田。

库尔勒取样重病田为无病田内隔离出,面积约 3500m^2,通过连续 3a 人工接种大丽轮枝菌使之成为重病田;轻病田为紧邻的自然棉田,管理措施一致。

石河子轻病田和重病田均为自然棉田,未进行人工干预。

1.1.4 培养基

马丁氏培养基(链霉素 200mg/L),高氏一号培养基(重铬酸钾 50mg/L),改良微菌核选择分离培养基(青霉素 200mg/L)[17],肉汤培养基(Lysogeny broth medium,LB),胰蛋白胨大豆琼脂培养基(Tryptone soy agar

medium,TSA),马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato dextrose agar medium,PDA)。

1.2　大丽轮枝菌发酵液对细菌生长量影响测定

利用 PDA 培养液培养菌株 V991 和菌株 V250,27℃下在 120r/min 摇床上振荡培养 14d,之后 8000r/min 离心 15min,收集上清液,利用 0.22μm 细菌过滤器过滤除菌,-4℃保存备用。空白 PDA 培养液作为对照。

试验设 5 个处理,分别接种培养 24h 的 AL7 菌液 5μL:①20mL LB 培养液;②16mL LB 培养液+4mL 大丽轮枝菌发酵上清液;③10mL LB 培养液+10mL 大丽轮枝菌发酵上清液;④4mL LB 培养液+16mL 大丽轮枝菌发酵上清液;⑤20mL 大丽轮枝菌发酵上清液。每处理以相同比例的 LB 培养液+PDA 空白培养液作为对照。30℃,200r/min 培养 10h,每隔 2h 利用分光光度计测量每处理 OD_{600} 值,3 次重复。培养 10h 后,取 5 次测量值的平均值作为衡量每处理中细菌 AL7 生长量的值。

1.3　土壤理化性质分析

分析 4 月 20 日与 8 月 10 日采集的 2 批土样的理化性质。每块棉田 3 点土样混合成 1 份土样。将处理好的土壤样品送交新疆土肥水农业科技工程中心进行统一化验。分析指标包括 pH 值、总盐、有机质、全氮、全磷、全钾、微生物氮。

1.4　土壤中可培养微生物数量检测

对阿克苏市、石河子市、库尔勒市采样田 4 个时期采集的 72 份土样,利用马丁式培养基、高氏一号培养基、TSA 培养基通过平板稀释分离法检测土壤中可培养真菌、放线菌、细菌的数量。

1.5　土壤中大丽轮枝菌微菌核分离

取 1.1.2 中 8 月份采集的棉田土样,水筛法处理后在改良微菌核选择分离培养基上利用平板稀释法分离土壤中大丽轮枝菌微菌核;取石河子重病田 4 个时期采集的土样,按照上述方法进行大丽轮枝菌微菌核分离。

1.6　高通量测序

1.6.1　土壤样品总 DNA 提取及检测

选择 4 月和 8 月份采集的 36 份土壤样品,每份土样称取 0.5g,利用 BioTeke DP4001 试剂盒提取土壤总 DNA。送交北京百迈客生物科技有限公司构建 DNA 文库,采用 Illumina Hiseq 2500 PE250 模式进行测序。扩增用引物及预扩增程序:细菌 16S rRNA (V3 + V4)区域引物:5′-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3′, 5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′;样品检测 PCR 预实验程序:95℃预变性 5 min;95℃变性 30s,50℃退火 30s、72℃延伸 40s,25cycles;72℃延伸 7min。

1.6.2　测序数据质量评估

对原始数据进行拼接(FLASH[18],version),将拼接得到的序列进行质量过滤(Trimmomatic[19],version),并去除嵌合体(UCHIME[20],version),得到高质量的 Tags 序列。

1.6.3　OTU 分析

在相似性 97%的水平上对序列进行聚类(UCLUST[21],version 1.2.22),以测序所有序列数的 0.005%作为阈值过滤 OTU[22]。

1.6.4　物种注释及分类学分析

细菌 16S 数据库:Silva[23];物种注释 RDP Classifier[24]:置信度阈值为 0.8;多重比对:PyNAST[25];建树方法:邻接法(Neighbor-Joining);分类学树状图分析:MEGAN5[26];alpha 多样性指数分析:Mothur[27] version v.1.30;Beta 多样性分析($n \geq 3$):基于 binary jaccard、bray curtis、(un)weighted unifrac(限细菌)多种算法呈现物种多样性矩阵。

1.7　数据分析

常规数据利用 Excel、SPSS 软件进行数据汇总、计算和作图。

2 结果与分析

2.1 大丽轮枝菌发酵液对细菌 AL7 生长量的影响

随着大丽轮枝菌发酵上清液比例增加,培养 10h 后,不同处理中细菌 AL7 的生长量呈逐渐降低的趋势,而对照处理中细菌 AL7 的生长没有受到 PDA 培养液的抑制(图 1)。结果表明,大丽轮枝菌菌株 V991、V250 的发酵上清液均能对细菌 AL7 的生长起到明显的抑制作用。

强致病力菌株 V991 发酵上清液对细菌 AL7 生长的抑制作用超过弱致病力菌株 V250,说明致病力强菌株产生的次生代谢产物或营养竞争能力相比弱致病力菌株对细菌 AL7 的生长影响更大。

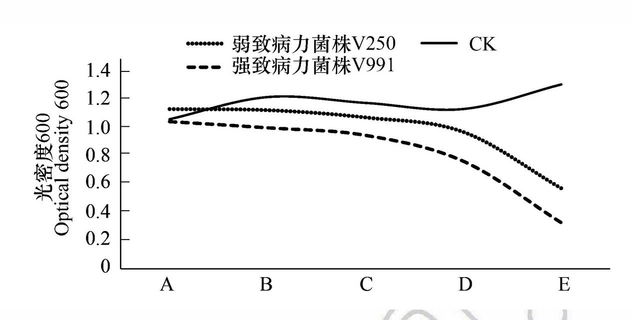


图 1 细菌 AL7 在大丽轮枝菌发酵液中的生长趋势

Fig. 1 The growth tendency of bacteria strain AL7 in supernatant of *V. dahliae*

A:肉汤培养液,Lysogeny broth;B:8 比 2 的肉汤培养液与大丽轮枝菌发酵液混合液,8 compares 2 mixture of lysogeny broth with potato dextrose agar fluid medium;C:1 比 1 的肉汤培养液与大丽轮枝菌发酵液混合液,1 compares 1 mixture of lysogeny broth with potato dextrose agar fluid medium;D:2 比 8 的肉汤培养液与大丽轮枝菌发酵液混合液,2 compares 8 mixture of lysogeny broth with potato dextrose agar fluid medium;E:大丽轮枝菌发酵液,Potato dextrose agar fluid medium

2.2 不同发病程度棉田土壤的理化性质分析

经化验分析(表 1),阿克苏市、石河子市、库尔勒市 3 个地区 6 块取样棉田土壤样品的 pH 值在 7.97—8.46 之间,均为偏碱性土壤。库尔勒采样棉田盐份含量显著高于阿克苏市和石河子市采样棉田,是阿克苏市和石河子市采用棉田的 6 至 10 倍左右,阿克苏市经水稻轮作改良的无病棉田盐份含量显著低于相邻的常年连作重病田,体现了水旱轮作防病、降盐的特点。

从土壤肥力水平来看,石河子市采样棉田有机质、全氮、全磷含量均为 3 个采样地区中的最高值,其中石河子市采样重病田中有机质、全氮含量分别达到了 38.66g/kg 土和 2.025g/kg 土,约为石河子对照轻病田的 2 倍,土壤肥力水平高;库尔勒采样重病田土壤中有机质、全氮、全磷、全钾含量均与轻病田无明显差异;阿克苏市水稻改良后的无病棉田土壤中有机质、全氮、全磷、生物氮量均略高于相邻重病田。

表 1 不同地区棉田土壤理化性质/(g/kg)

Table 1 Physical and chemical properties of cotton soil in different regions

取样地点 Sampling location	病情指数 Disease index	棉田类型 Field type	酸碱度 pH	总盐 Total salt/(g/kg)	有机质 Organic matter/(g/kg)	全氮 Total nitrogen/(g/kg)	全磷 Total phosphorus/(g/kg)	全钾 Total potassium/(g/kg)	生物量氮 Biomass-N/(mg/kg)
阿克苏市	58.7	重病田	8.39	1.75	8.31	0.45	0.63	18.70	52.85
	0.0	无病田	8.46	0.95	11.59	0.61	0.76	18.73	84.57
石河子市	94.5	重病田	8.44	1.10	38.66	2.02	0.96	16.09	52.85
	24.5	轻病田	8.44	1.35	17.36	1.04	0.95	20.66	31.72
库尔勒市	80.8	重病田	7.99	9.60	8.56	0.40	0.72	16.57	67.39
	2.5	轻病田	7.97	11.10	9.31	0.44	0.62	16.45	51.53

2.3 不同发病程度棉田土壤中可培养微生物数量分析

2.3.1 不同发病程度棉田土壤中的细菌数量

分析结果表明(表 2),阿克苏市采样重病田中细菌数量除 5 月份低于对照田外,4 月、6 月、8 月份 3 个时期土壤中细菌数量均显著高于轻病田;库尔勒市重病田土壤中 4 月份与 8 月份细菌数量高于对照田,5 月份和 6 月份则低于对照田,重病田和对照轻病田中细菌数量趋势呈交替变化,均无显著差异;石河子市重病田 4

个时期土壤中细菌数量均高于轻病田,除 8 月份外,重病田土壤中的细菌数量均显著高于轻病对照田。

2.3.2 不同发病程度棉田土壤中的真菌数量

阿克苏市采样重病田中真菌数量除 4 月份低于无病对照田以外,5 月份、6 月份与 8 月份重病田土壤中真菌数量均高于无病对照田,其中 6 月份达到显著性差异;库尔勒市采样重病田土壤中真菌数量除 6 月份以外,均略低于轻病对照田,但 4 个时期均未达显著性差异;石河子市重病田其全生育期土壤中真菌数量均高于轻病田,且在 4 月份、5 月份、6 月份均达到显著差异(表 3)。

表 2 不同时期土壤中细菌数量/($\times 5\times 10^6$)

Table 2 Bacterial quantity of soil in different times

采集地点 Sampling location	棉田类型 Field type	采样时期 Sampling time 4 月 20 日 April 20	5 月 20 日 May 20	6 月 20 日 June 20	8 月 10 日 August 10
阿克苏市	重病田	84.2±33.0b	69.3±7.5a	83.3±13.7b	52.7±5.0b
	无病田	23.8±2.7a	91.6±96.9a	50.4±6.0a	28.7±2.6a
库尔勒市	重病田	21.6±8.1a	43.9±24.8a	12.7±4.4a	36.8±17.1a
	轻病田	17.4±2.8a	61.7±17.4a	41.9±36.5a	16.4±8.3a
石河子市	重病田	27.4±7.1b	21.8±6.4b	27.3±6.7b	11.2±9.9a
	轻病田	11.8±6.6a	6.8±2.3a	14.6±10.3a	11.1±9.1a

a,b 代表显著性差异分析,相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异

表 3 不同时期土壤中真菌数量/($\times 5\times 10^5$)

Table 3 Fungus quantity of soil in different times

采集地点 Sampling location	棉田类型 Field type	采样时期 Sampling time 4 月 20 日 April 20	5 月 20 日 May 20	6 月 20 日 June 20	8 月 10 日 August 10
阿克苏市	重病田	8.9±4.2a	11.6±7.2a	13.4±2.7b	14.9±3.1a
	无病田	11.0±4.3a	9.9±0.7a	4.8±1.1a	14.4±4.7a
库尔勒市	重病田	12.3±0.9a	10.0±2.8a	5.0±1.8a	7.2±1.7a
	轻病田	14.1±5.4a	12.1±5.7a	2.6±0.8a	9.8±1.6a
石河子市	重病田	15.4±2.7b	12.4±3.1b	10.8±4.2b	16.6±5.3a
	轻病田	8.2±3.1a	4.1±1.4a	4.2±1.0a	13.8±4.2a

a,b 代表显著性差异分析,相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异

2.3.3 不同发病程度棉田土壤中放线菌数量

石河子市采样棉田中放线菌数量基数很大,每克土中最高可达 1×10^8 个。阿克苏市采样无病田土壤肥力指标均高于重病田(表 1),无病对照田 4 个时期土壤中放线菌含量均高于重病田,且在 5 月份和 8 月份达到显著差异;库尔勒市重病田由人工接菌造成,轻病对照田为紧邻棉田,两地土壤肥力差异很小(表 1),放线菌数量表现出呈交替变化的趋势,仅在 8 月份出现了显著差异;石河子市重病田土壤中有机质、全氮含量均显著高于轻病对照田,重病田 4 个时期土壤中放线菌的含量同样显著高于轻病田(表 4)。

表 4 不同时期土壤中放线菌数量/($\times 5\times 10^5$)

Table 4 Actinomycetes quantity of soil in different times

采集地点 Sampling location	棉田类型 Field type	采样时期 Sampling time 4 月 20 日 April 20	5 月 20 日 May 20	6 月 20 日 June 20	8 月 10 日 August 10
阿克苏市	重病田	128.8±36.6a	177.0±39.2a	236.1±41.2a	104.9±8.4a
	无病田	155.2±27.3a	262.4±15.4b	243.4±47.2a	177.1±22.2b
库尔勒市	重病田	157.9±9.7a	213.6±12.3a	199.2±25.6a	191.9±64.5b
	轻病田	191.8±47.9a	183.4±99.1a	202.6±38.7a	160.4±21.0a
石河子市	重病田	628.2±66.3b	235.1±32.5b	317.2±47.2b	319.6±51.1b
	轻病田	291.1±51.7a	157.1±38.6a	211.6±39.8a	187.7±34.6a

a,b 代表显著性差异分析,相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异

2.3.4 不同发病程度棉田土壤中大丽轮枝菌微菌核数量

经分析(表5),阿克苏市、石河子市、库尔勒市每个地区重病田和轻病田土壤中大丽轮枝菌微菌核数量均达到显著性差异。

阿克苏市采样重病田8月10日棉花黄萎病病情指数为58.7,每克土中分离出的大丽轮枝菌微菌核数量为40个,而前期为重病田,经水稻轮作改良后的对照棉田黄萎病病情指数为0,其耕层土中未分离到大丽轮枝菌微菌核;石河子市采样重病田同时期棉花黄萎病病情指数为94.5,每克土中平均分离出的大丽轮枝菌微菌核数量为193个,对照轻病田每克耕层土中大丽轮枝菌微菌核数量为6个,病情指数为24.5;库尔勒市人工接菌重病田同期棉花黄萎病病情指数为80.8,每克土中大丽轮枝菌微菌核数量为73个,对照轻病田每克土中棉花黄萎病微菌核数量为17个,病情指数为2.5。

为探明新疆棉田土壤中大丽轮枝菌微菌核含量的消长动态,对石河子重病田4个时期采集的土壤中微菌核的含量进行了分析。结果显示,4月份石河子重病田每克土中大丽轮枝菌微菌核数量为119个;5月份采集土壤中大丽轮枝菌微菌核数量最高,每克土中微菌核数量达196个,至6月份略有降低,为155个/g土,8月份土壤中微菌核的数量为132个/g土,低于6月份,略高于4月份(图2)。土壤中大丽轮枝菌微菌核的含量全年出现1个高峰,呈现先增高后逐渐降低的趋势。

表5 棉田黄萎病发生程度及10cm耕层土壤中大丽轮枝菌微菌核数量

Table 5 Micro sclerotium quantity of cotton field in 10 centimeters deep and disease index of *Verticillium* wilt

取样地点 Sampling location	菌核数量 Micro sclerotium quantity	病情指数 Disease index
阿克苏	40±1.21b	58.7b
	0a	0a
石河子	193±7.99b	94.5b
	6±1.10a	24.5a
库尔勒	73±2.64b	80.8b
	17±0.98a	2.5a

a,b代表显著性差异分析,相同字母代表无显著性差异,不同字母代表有显著性差异

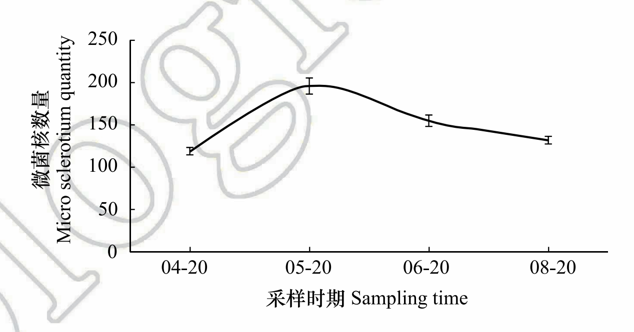


图2 不同时期棉田10cm耕层土壤中大丽轮枝菌微菌核含量的动态变化

Fig.2 Dynamics of micro sclerotium quantity in 10 centimeters deep of cotton field in different times

2.4 土壤中可培养微生物数量的相关性与棉花黄萎病发生程度分析

2.4.1 土壤中大丽轮枝菌微菌核含量与棉花黄萎病发生程度的相关性

阿克苏市无病棉田未检测到大丽轮枝菌微菌核,石河子市、库尔勒市发病严重棉田土壤中微菌核数量均显著高于发病轻棉田。相关性分析表明(图3),大丽轮枝菌微菌核含量与棉花黄萎病发生程度的 R^2 = 0.8474 (*Sig.* =0.036),为显著正相关,在一定范围内,大丽轮枝菌微菌核数量越多,棉花黄萎病发生越重。

2.4.2 土壤中大丽轮枝菌微菌核含量与细菌、真菌、放线菌数量的相关性

试验分析证明棉花黄萎病的发生程度与土壤中的大丽轮枝菌微菌核含量呈显著正相关,而大丽轮枝菌发酵液能够对细菌生长产生抑制作用。但是,对不同棉田

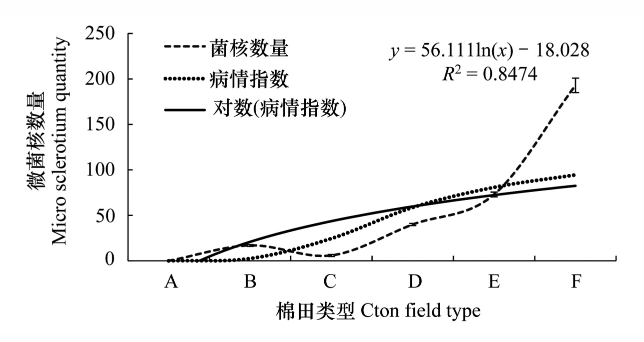


图3 大丽轮枝菌微菌核含量与棉花黄萎病发病程度的相关性

Fig. 3 The correlationship of Micro sclerotium quantity and disease degree of *Verticillium* wilt

A:阿克苏无病田, Disease-free field of Aksu;B:库尔勒轻病田, Mild disease field of Korla;C:石河子轻病田,Mild disease field of Shihezi;D:阿克苏重病田,Serious disease field of Aksu;E:库尔勒重病田,Serious disease field of Korla;F:石河子重病田,Serious disease field of Shihezi

土壤中大丽轮枝菌微菌核含量与放线菌、真菌、细菌数量的相关性分析表明,土壤中各微生物种群之间没有显著相关性(表 6)。

表 6　微生物数量与棉花黄萎病发生程度相关性

Table 6　The correlationship of microbial population and disease degree of *Verticillium* wilt

生物类群 Biological group	相关分析 Correlation analysis	微菌核 Micro sclerotium	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungus	细菌 Bacteria
微菌核 Micro sclerotium	皮尔逊相关系数	1.000	−0.773	−0.657	0.052
	Sig.		0.227	0.343	0.948
放线菌 Actinomycetes	皮尔逊相关系数	−0.773	1.000	0.454	0.430
	Sig.	0.227		0.546	0.570
真菌 Fungus	皮尔逊相关系数	−0.657	0.454	1.000	−0.599
	Sig.	0.343	0.546		0.401
细菌 Bacteria	皮尔逊相关系数	0.052	0.430	−0.599	1.000
	Sig.	0.948	0.570	0.401	

2.5　棉田土壤细菌群落结构的组成与多样性分析

对 36 个土壤样品进行高通量测序,共获得 4062258 对 Reads,双端 Reads 拼接、过滤后产生 3052997 条 Clean tags,平均每个样品产生 84805 条 Clean tags。

样本文库的覆盖率指数均在 99.6%以上,反映本次测序结果代表了样本中细菌种群的真实情况。各样品的菌群丰度指数(Chao1、Ace)、生物多样性指数(Shannon、Simpson)表明采集的土壤样品中的细菌种群多样性较高(表 7)。分析表明,在 97%相似度水平下,阿克苏市、库尔勒市重病田和轻病田分别采集的样品之间的操作分类单元(OUT)数目存在显著性差异,而石河子市重病田和轻病田采集的样品生物 OUT 数目不存在显著性差异。

表 7　不同样品中细菌群落多样性指数

Table 7　Diversity index of bacterial community in different samples

采样地点 Sampling location	棉田类型 Field type	采样时间 Sampling time	样品名称 Sample	操作分类单元 OTU	菌群丰度指数 ACE	菌群丰度指数 Chao1	1/辛普森指数 1/Simpson	香农指数 Shannon	覆盖率 Coverage/%
阿克苏市	无病田	4 月	a4w2	1870	1974.4	2004.5	180.4	6.3	99.7
			a4w4	1832	1957.8	1980.7	170.3	6.2	99.6
			a4w6	1823	1979.5	2040.9	125.5	6.1	99.6
		8 月	a8w1	1883	1983.1	2006.4	239.6	6.4	99.7
			a8w2	1916	2007.3	2026.3	301.7	6.5	99.7
			a8w3	1854	1954.6	1977.8	261.4	6.4	99.7
	重病田	4 月	an4b1	1955	2058.1	2074.2	164.4	6.3	99.7
			an4b3	1971	2069.6	2107.8	199.3	6.3	99.7
			an4b6	1837	1941.7	1973.2	157.9	6.2	99.7
		8 月	an8b1	1938	2026.5	2054.8	326.5	6.6	99.7
			an8b2	1919	2017.7	2034.6	224.5	6.4	99.7
			an8b3	1974	2058.4	2090.3	240.7	6.4	99.8
石河子市	轻病田	4 月	bn4w2	1796	1890.9	1911.3	251.1	6.4	99.7
			bn4w4	1722	1821.3	1835.1	171.0	6.2	99.7
			bn4w6	1723	1808.5	1836.8	224.2	6.3	99.8
		8 月	bn8w1	1658	1757.9	1798.3	210.9	6.2	99.7
			bn8w2	1777	1919.6	1949.9	235.1	6.3	99.6
			bn8w3	1751	1894.9	1959.1	209.0	6.2	99.6

续表

采样地点 Sampling location	棉田类型 Field type	采样时间 Sampling time	样品名称 Sample	操作分类单元 OTU	菌群丰度指数 ACE	菌群丰度指数 Chao1	1/辛普森指数 1/Simpson	香农指数 Shannon	覆盖率 Coverage/%
	重病田	4 月	sn4b2	1692	1765.1	1785.6	205.5	6.3	99.8
			sn4b4	1766	1838.3	1860.9	308.7	6.5	99.8
			sn4b6	1760	1843.8	1880.5	268.4	6.4	99.7
		8 月	sn8b1	1650	1724.3	1742.5	313.6	6.4	99.8
			sn8b2	1684	1778.3	1816.4	291.0	6.4	99.7
			sn8b3	1612	1707.3	1725.2	317.6	6.4	99.6
库尔勒市	轻病田	4 月	k4c1	1448	1544.8	1580.6	50.3	5.6	99.8
			k4c2	1317	1429.0	1482.8	74.5	5.5	99.8
			k4c3	1372	1482.8	1531.8	93.3	5.7	99.6
		8 月	k8c1	1443	1529.5	1564.8	200.8	6.1	99.8
			k8c2	1496	1572.7	1609.1	174.0	6.1	99.8
			k8c3	1569	1679.2	1740.1	246.9	6.3	99.7
	重病田	4 月	k4v1	1570	1642.3	1675.0	68.2	5.8	99.8
			k4v2	1566	1678.6	1755.5	128.3	6.0	99.8
			k4v3	1559	1634.2	1670.8	130.8	6.0	99.8
		8 月	k8v1	1615	1676.8	1707.4	219.1	6.3	99.8
			k8v2	1568	1642.2	1658.9	187.9	6.1	99.8
			k8v3	1620	1698.3	1746.2	211.1	6.2	99.8

OTUs:Operational taxonomic units,操作分类单元;a4w2、a4w4、a4w6: 4 月份阿克苏无病田土壤样品;a8w1、a8w2、a8w3:8 月份阿克苏无病田土壤样品;an4b1、an4b3、an4b6:4 月份阿克苏重病田土壤样品;an8b1、an8b2、an8b3:8 月份阿克苏重病田土壤样品;bn4w2、bn4w4、bn4w6:4 月份石河子轻病田土壤样品;bn8w1、bn8w2、bn8w3:8 月份石河子轻病田土壤样品;sn4b2、sn4b4、sn4b6:4 月份石河子重病田土壤样品;sn8b1、sn8b2、sn8b3:8 月份石河子重病田土壤样品;k4c1、k4c2、k4c3:4 月份库尔勒轻病田土壤样品;k8c1、k8c2、k8c3:8 月份库尔勒轻病田土壤样品;k4v1、k4v2、k4v3:4 月份库尔勒重病田土壤样品;k8v1、k8v2、k8v3:8 月份库尔勒重病田土壤样品

2.5.1 不同土壤中细菌群落结构的多样性分析

根据 36 个土壤样品中细菌 OTU 类型的丰度值利用非度量多维尺度法(NMDS)进行多样性分析,比较不同样品在细菌 OTUs 组成上的差异。在应力值=0.055 水平上,不同土壤中的细菌菌群受采集地点差异的影响最大(图 4),同一棉田采集的土壤样品中细菌菌群相似,距离最近;继而是同一地区土壤样品中的菌群相似,距离次之。阿克苏市和石河子市土壤样品采集的棉田是相互独立的,因此在不同的棉田水平上,阿克苏、石河子采样重病田和轻病田土壤中的细菌菌群距离较近,均能够独立区分开来。而库尔勒市土壤样品中细菌菌群受采集棉田的影响较小,不同棉田土壤样品中细菌菌群距离较远;反而受采样时间的影响较大,同一时期采集的土壤中细菌菌群距离更近,表明棉田接种大丽轮枝菌并未对土壤中细菌菌群造成明显影响。

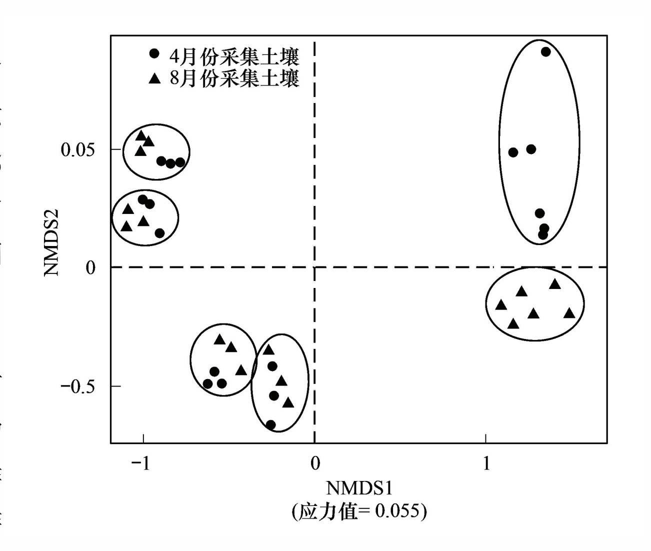


图 4 不同样品中细菌群落多样性的 NMDS 分析

Fig.4 NMDS analysis of bacterial community diversity

NMDS:非度量多维尺度法,non-metric multidimensional scaling

2.5.2 不同土壤中细菌群落结构的聚类分析

对 36 个样品基于 Beta 多样性分析得到距离矩阵,通过非加权组平均法(UPGMA)进行层次聚类分析(图 5)。同一地区采集的土壤样品均单独归为一支,其中阿克苏市采集的土壤样品与石河子市采集的土壤样品

归为一个大的分支,库尔勒市采集的样品单独归为一支,在物种组成上阿克苏市土壤样品与石河子市土壤样品较库尔勒地区更近。

具体到采样棉田,阿克苏市同一棉田不同时期采集的土壤样品能够聚为一支;更进一步,同一时期的采集土壤样品归为一支。石河子市采集土壤样品的物种组成聚类情况与阿克苏相同,同一时期、同一棉田均能够单独归为一支。

库尔勒市采样棉田的物种组成聚类分析结果与阿克苏和石河子不同,由于库尔勒采样的重病田与轻病田为同一块棉田隔离而来,且管理措施一致,因此在棉田水平上没有把重病田与轻病田单独归为一支,反而是相同采样时期的土壤样品中物种组成更为接近,4 月份采集的样品和 8 月份采集的样品各自归为一支,该结果与 NMDS 分析结果一致,充分说明人工接入大丽轮枝菌短期内对土壤细菌种群未产生明显影响。

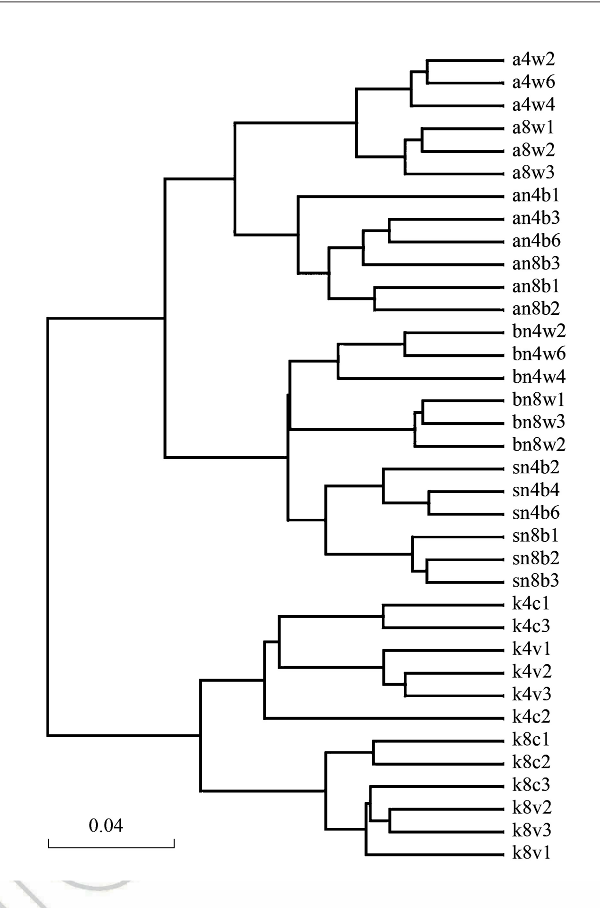


图 5　不同样品中细菌群落组成的层次聚类分析

Fig.5　Hierarchical cluster analysis of bacterial community composition in different samples

3　讨论

本研究旨在分析棉田土壤中大丽轮枝菌与微生物群落变化之间的相关性,通过研究棉花黄萎病不同发病程度棉田土壤中微生物群落的结构差异,探究土壤中制约棉花黄萎病发生的关键因素,为利用微生态调控措施防控棉花黄萎病提供理论依据。

本文研究表明,在纯培养条件下,大丽轮枝菌无菌发酵滤液对细菌 AL7 的生长起明显的抑制作用,且强致病力菌株的抑制能力更高,可能是大丽轮枝菌的致萎毒素[28]抑制了细菌的生长或大丽轮枝菌生长消耗了 PDA 培养液中的营养物质所致。据此推测,当土壤中大丽轮枝菌种群达到一定数量时,可能会通过致萎毒素直接抑制或通过侵染棉花引起根系分泌物的改变来影响土壤微生物的种群结构[29-31]。但是,库尔勒市采样的无病棉田通过连续 3 年人工大量接种大丽轮枝菌使之成为棉花黄萎病重病田后,经土壤微生物数量分析发现,与轻病对照田相比,细菌、真菌、放线菌的数量动态呈交替变化的趋势,各微生物类群数量均没有明显的差异;结合高通量测序,对各样品进行 NMDS 和层次聚类分析,也得出接种大丽轮枝菌并未对土壤中细菌菌群遗传关系产生较大影响的结论。加之,石河子、阿克苏棉花黄萎病重病田中细菌数量反而显著高于轻病田(阿克苏重病田 5 月份样品除外),据此认为,短时期内大丽轮枝菌并不能够引起棉田土壤中细菌菌群的明显改变。

研究认为细菌型土壤是土壤肥力提高的一个生物指标[32],李秀英[33]、章家恩[34]等认为土壤养分含量与微生物数量存在较好的正相关性,土壤微生物的数量高低在一定程度上反映了土壤的肥力水平。石河子采样重病田为连作 20 年以上棉田,该棉田土壤肥力水平较高,土壤中的有机质、全氮含量 2—4 倍高于其他棉田;同时,该棉田黄萎病发病最重,病情指数接近 100,土壤中大丽轮枝菌微菌核含量高达近 200 个/g 土。高通量测序表明该田与石河子轻病对照田内细菌群落存在遗传差异,且重病田其土壤中细菌、真菌、放线菌数量均显著高于对照轻病田,与张海燕等对新疆南疆不同连作年限棉田土壤微生物群落结构研究的结果接近[35]。该结果证明了土壤肥力水平和微生物数量高的棉田并不能有效降低发病,而土壤中的大丽轮枝菌数量才是决定棉花黄萎病发生的主导因素。棉田土壤中有机质主要来源于棉籽饼以及棉秸秆还田等,当常年棉花连作加之

带菌秸秆还田会造成大量的病原菌积累,就会导致棉花黄萎病的严重发生。控制该病关键在于利用生物防治、轮作、深翻等生态调控手段增加土壤中有益菌群数量,降低耕层土壤中菌源数量,同时种植抗病品种结合改善土壤生态、水肥条件加之健康的农事管理促进棉花健康生长,降低该病的危害。

土壤中是否存在大丽轮枝菌微菌核是棉花黄萎病能否发生流行的先决条件。研究认为,每克土壤中0.03个微菌核就可造成发病,每克土壤中微菌核3.5个以上该病的发病率可达100%[36];另有研究认为导致棉花黄萎病发病的临界量为0.5个/g土[37-38]。本文研究发现,石河子、库尔勒轻病田8月份每克土壤中微菌核数量分别为6个和17个,对应病情指数则分别为24.5和2.5,发病率未达100%,说明发病程度不是单纯的由菌源数量决定,而是由棉花品种的抗病性以及大丽轮枝菌的致病力等因素在黄萎病发生程度与菌核数量的相互关系上起到主导作用。阿克苏棉花黄萎病重病田经过水稻轮作后未发生黄萎病,土壤中也未分离到大丽轮枝菌微菌核,充分证明了菌源是该病发生的先决条件,同样也证明了水旱轮作对土传病害极佳的控制效果[15]。

土壤中大丽轮枝菌微菌核含量与细菌、真菌、放线菌数量的相关性分析同样证明,棉花黄萎病的发生与大丽轮枝菌微菌核含量呈显著正相关,与放线菌、真菌、细菌三大微生物种群之间没有显著相关性。制约棉田土壤中微生物群落的因素很多。前人研究认为,棉花抗枯萎病品种连作田枯萎病菌数量明显少于重病田[4-5],连作是新疆棉花种植中的突出问题,长期连作造成棉花根际微生物多样性水平降低,土壤中三大类微生物总数下降[10],病原拮抗菌减少,土壤酶活性下降[11]。秸秆还田虽然能提高连作棉田土壤微生物量的含量,缓解棉花连作的不利影响,提高土壤质量[14],但是从病原菌传播、积累的角度来看,当棉田黄萎病发生时该模式不利于控制棉花黄萎病的蔓延。而轮作可提高土壤酶活性和微生物群落结构多样性,水稻棉花轮作[16]、蒜棉套作、麦棉套作[15]均提高棉田土壤微生物中细菌和放线菌的数量,有效抑制棉田连作障碍的发生。

本文研究表明,水稻轮作能够有效降盐、减病、改善土壤肥力;接种大丽轮枝菌短期内不能造成土壤微生物群落结构的明显改变;常年连作的重病田在土壤肥力高的情况下,土壤中微生物种群数量会高于健康棉田。不同类型棉田土壤中微生物群落主要受土壤肥力、栽培措施、种植品种等因素影响,土壤中大丽轮枝菌微菌核数量与棉花黄萎病的发生程度之间呈显著正相关,但并未显著造成微生物数量的变化。改善棉田土壤微生物群落结构可能会一定程度促进棉田土壤生态健康,但是,通过生物防治水旱、轮作、机械深翻等调控措施降低棉田耕层土壤中病原菌数量,才是减轻棉花黄萎病危害的基础。

致谢: 感谢中国农业科学院植物保护研究所简桂良研究员惠赠2株大丽轮枝菌标准菌株,感谢新疆农垦科学院植物保护研究所刘政和新疆兵团第一师农科所武刚在土壤样品采集过程中给予的帮助。

参考文献(References):

[1] 刘海洋, 王伟, 张仁福, 武刚, 姚举. 新疆主要棉区棉花黄萎病发生概况. 植物保护, 2015, 41(3): 138-142.
[2] 马平. 棉花黄萎病生物防治研究进展. 河北农业科学, 2003, 7(3): 38-44.
[3] Neal J L Jr, Atkinson T G, Larson R I. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. Canadian Journal of Microbiology, 1970, 16(3): 153-158.
[4] 吴传德, 延欣芳. 棉花抗枯萎病品种连作防病效果的研究. 植物保护学报, 1985, 12(3): 195-200.
[5] 王守正, 王海燕, 李洪连, 于思勤, 袁红霞, 岳红宾. 植物微生物区系和植物抗病性研究. 河南农业科学, 2001, (5): 20-23.
[6] 张美俊, 杨武德, 李燕娥. 不同生育期转Bt基因棉种植对根际土壤微生物的影响. 植物生态学报, 2008, 32(1): 197-203.
[7] 李永山, 范巧兰, 陈耕, 柴永峰, 张冬梅, 李燕娥. 利用PLFA方法研究转Bt基因棉花对土壤微生物群落结构变化的影响. 棉花学报, 2009, 21(6): 503-507.
[8] 范巧兰, 陈耕, 李永山, 柴永峰, 张冬梅, 李燕娥. 转Bt基因棉花不同生育期对土壤微生物的影响. 山西农业科学, 2010, 38(12): 34-36.
[9] 娜布其, 红雨, 杨殿林, 赵建宁, 李刚, 娜日苏, 刘玲. 利用根箱法解析转双价(*Bt+CpTI*)基因棉花对土壤微生物数量及细菌多样性的影响. 棉花学报, 2011, 23(2): 160-166.
[10] 施宠, 梁智, 徐万里, 单鸿宾, 贾宏涛, 王丽. 不同连作年限棉田土壤微生物和酶的特征. 新疆农业科学, 2010, 47(1): 163-167.

[11] 李锐, 刘瑜, 褚贵新. 不同种植方式对绿洲农田土壤酶活性与微生物多样性的影响. 应用生态学报, 2015, 26(2): 490-496.

[12] 高旭梅, 刘娟, 张前兵, 罗宏海, 谷天佐, 张旺锋. 耕作措施对新疆绿洲长期连作棉田土壤微生物、酶活性的影响. 石河子大学学报: 自然科学版, 2011, 29(2): 145-152.

[13] 顾美英, 徐万里, 茆军, 梁智, 张志东, 房世杰. 连作对新疆绿洲棉田土壤微生物数量及酶活性的影响. 干旱地区农业研究, 2009, 27(1): 1-5, 11-11.

[14] 郭成藏, 李鲁华, 黄金花, 刘军, 杨志兰, 魏飞, 刘建国. 秸秆还田对长期连作棉田土壤微生物量碳氮磷的影响. 农业资源与环境学报, 2015, 32(3): 296-304.

[15] 赵庆龙, 宋宪亮, 孙学振, 张美玲, 李宗泰. 蒜棉、麦棉套作对土壤微生物数量及相关酶活性的影响. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(6): 1474-1480.

[16] 徐幼平, 蔡新忠, 祝小祥. 水旱作物轮作田块土壤中微生物群落结构的 PLFA 法比较分析. 浙江农业学报, 2013, 25(5): 1056-1061.

[17] 冯争光, 鹿秀云, 彭巧慧, 马平, 董金皋. 一种新的检测土壤棉花黄萎菌微菌核的选择性培养基. 华北农学报, 2004, 19(S): 44-47.

[18] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.

[19] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[20] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200.

[21] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.

[22] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, Gevers D, Gordon J I, Knight R, Mills D A, Caporaso J G. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. Nature Methods, 2013, 10(1): 57-59.

[23] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner F O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D590-D596.

[24] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole J R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.

[25] Caporaso J G, Bittinger K, Bushman F D, DeSantis T Z, Andersen G L, Knight R. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. Bioinformatics, 2010, 26(2): 266-267.

[26] Huson D H, Auch A F, Qi J, Schuster S C. MEGAN analysis of metagenomic data. Genome Research, 2007, 17(3): 377-386.

[27] Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T, Hall J R, Hartmann M, Hollister E B, Lesniewski R A, Oakley B B, Parks D H, Robinson C J, Sahl J W, Stres B, Thallinger G G, Van Horn D J, Weber C F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.

[28] 桑茜, 袁虹霞, 王振跃, 李洪连, 汪敏. 河南省不同地区棉花黄萎病菌分离物致病性及其毒素致萎活性测定. 棉花学报, 2010, 22(4): 333-338.

[29] 董丽红, 郭庆港, 张晓云, 李社增, 鹿秀云, 马平. 棉花根系分泌物对枯草芽胞杆菌 NCD-2 生物膜形成和根际定殖的影响. 植物病理学报, 2015, 45(5): 541-547.

[30] 孙磊, 陈兵林, 周治国. 麦棉套作 Bt 棉花根系分泌物对土壤速效养分及微生物的影响. 棉花学报, 2007, 19(1): 18-22.

[31] 赵小亮, 刘新虎, 贺江舟, 万传星, 龚明福, 张利莉. 棉花根系分泌物对土壤速效养分和酶活性及微生物数量的影响. 西北植物学报, 2009, 29(7): 1426-1431.

[32] 张丽娟, 曲继松, 郭文忠, 杨冬艳, 冯海萍. 微生物菌肥对黄河上游地区设施土壤微生物及酶活性的影响. 中国土壤与肥料, 2014, (5): 32-36.

[33] 李秀英, 赵秉强, 李絮花, 李燕婷, 孙瑞莲, 朱鲁生, 徐晶, 王丽霞, 李小平, 张夫道. 不同施肥制度对土壤微生物的影响及其与土壤肥力的关系. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1591-1599.

[34] 章家恩, 刘文高, 胡刚. 不同土地利用方式下土壤微生物数量与土壤肥力的关系. 土壤与环境, 2002, 11(2): 140-143.

[35] 张海燕, 贺江舟, 徐彪, 龚明福, 张利莉. 新疆南疆不同连作年限棉田土壤微生物群落结构的变化. 微生物学通报, 2010, 37(5): 689-695.

[36] 董金皋. 农业植物病理学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 203-207.

[37] 石磊岩, 简桂良, 孙文姬, 冯洁. 我国棉花黄萎病研究现状与方向. 植物保护学报, 1998, 25(2): 103-107.

[38] 简桂良, 邹亚飞, 马存. 棉花黄萎病连年流行的原因及对策. 中国棉花, 2003, 30(3): 13-14.